

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Biochemie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H.-J. Dulce

UNTERSUCHUNGEN ZUR KREUZRESISTENZ
EINES CYCLOPHOSPHAMID-RESISTENTEN
YOSHIDA-ASCITESTUMORS GEGEN EINIGE
ALKYLIERENDE CYTOSTATIKA

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heinrich Helmut Gerhartz
aus Berlin

1977

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Biochemie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H.-J. Dulce

UNTERSUCHUNGEN ZUR KREUZRESISTENZ
EINES CYCLOPHOSPHAMID-RESISTENTEN
YOSHIDA-ASCITESTUMORS GEGEN EINIGE
ALKYLIERENDE CYTOSTATIKA

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heinrich Helmut Gerhartz
aus Berlin

Referent: Professor Dr. E. Liss

Korreferent: Professor Dr. D. Neubert



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 9. Mai 1977

Untersuchungen zur Kreuzresistenz
eines Cyclophosphamid-resistenten
Yoshida-Ascitestumors gegen einige
alkylierende Cytostatika

Inhalt

Seite

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	5
1. Versuchstiere	5
2. Tumorzellen	5
3. Cytostatisch wirksame Substanzen	5
4. Bestimmung der Hemmung der Zellvermehrung nach in vitro Inkubation	5
a) Inkubation	5
b) Bestimmung der Zellvermehrung	6
5. Bestimmung der Hemmung der Zellvermehrung nach in vivo Applikation	7
6. Berechnung der Dosis-Wirkungs-Beziehung	8
7. Berechnung des Resistenzfaktors	9
III. Ergebnisse	10
1. Vergleich der Wirkung der Cytostatika gegen den sensitiven und den resistenten Yoshida- Ascitestumor	10
a) Cyclophosphamid	10
b) 4-Hydroperoxycyclophosphamid (Peroxyd)	11
c) Triaziquon (Trenimon ^R)	11
d) N-Oxyd-Lost (Mitomen ^R)	15
e) N-Methyl-Lost	15
2. Vergleich der Mengen der einzelnen Cytostatika, die zur Hemmung der Zellvermehrung auf 50% notwendig sind	19

IV. Diskussion

1. Resistenzfaktor und Kreuzresistenz	20
2. Vergleich verschiedener Methoden zur Messung der Hemmung der Zellproliferation	22
3. Vergleich der Konzentrationsbereiche der untersuchten Cytostatika	24
4. Mechanismus der Resistenz gegen alkylierende Cytostatika	25
a) Veränderungen im Metabolismus	25
b) Verminderte Substanzaufnahme	26
c) Metabolitenbereitstellung	27
d) SH-Gruppen und nucleophile Gruppen als Schutz vor Alkylierung	28
e) Die Bedeutung von DNA-Reparaturmechanismen für eine Resistenz gegen alkylierende Cytostatika	28
f) Qualitative Unterschiede zwischen sensiblen und resistenten Tumorzellstämmen	30
g) Chromosomenveränderungen als Ursache der Resistenz	30

V. Zusammenfassung	32
--------------------	----

VI. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

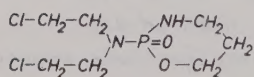
Resistenz gegen cytostatisch wirksame Verbindungen wurde sowohl bei der klinischen Behandlung von Tumoren (4) als auch bei tierexperimentellen Transplantations-tumoren immer wieder beobachtet (29). Man bezeichnet einen Tumor als resistent, wenn er auch bei Anwesenheit von Cytostatika-Konzentrationen wächst, die ursprünglich in der Lage waren, sein Wachstum zu hemmen. Viele dieser Tumoren waren nicht nur gegen diejenige Substanz unempfindlich, mit der sie behandelt worden waren, sondern auch gegen eine Reihe weiterer, meist chemisch ähnlicher Cytostatika. Untersuchungen zur Kreuzresistenz von Cytostatika ermöglichen daher einerseits Vorhersagen über die Wirksamkeit dieser Medikamente bei der klinischen Anwendung zu treffen, andererseits Erkenntnisse über ihren Wirkungsmechanismus zu gewinnen.

Die vorliegenden Untersuchungen betreffen alkylierende Cytostatika. Dies sind Verbindungen, die im physiologischen Milieu Alkylgruppen auf elektronenreiche Rezeptorstellen an Zellbestandteilen übertragen können (25). Ein gegen eine von diesen Substanzen, nämlich das Cyclophosphamid, resistenter Yoshida-Ascitestumor konnte aus einer sensitiven Stammlinie gezüchtet werden, indem der Tumor vor jeder zweiten Transplantation mit ansteigenden Dosen des Cytostatikums behandelt wurde.

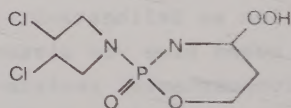
Cyclophosphamid (Endoxan^R, N-Bis(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureester-diamid) ist wegen seines besonders günstigen therapeutischen Index (6) der klinisch am meisten verwendete Vertreter dieser Gruppe (10, 25).

Im Gegensatz zu fast allen anderen alkylierenden Verbindungen wird Cyclophosphamid jedoch erst in vivo in die cytostatisch wirksame Form überführt. BROCK und HOHORST konnten zeigen, daß diese "Giftung" in der Mikrosomenfraktion der Säugetierleber stattfindet (7). TAKAMIZAWA u.A. gelang die chemische Synthese des cytostatisch wirksamen Cyclophosphamid-Umwandlungsproduktes 4-Hydroxycyclophosphamid (44), das, wie VOELCKER zeigen konnte, in vivo im Gleichgewicht steht mit Aldophosphamid. Aus Letzterem entsteht unter Acroleinabspaltung N-Bis-(2-chloräthyl)-phosphorsäurediamid (48).

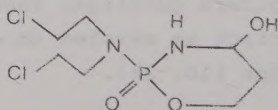
4-Hydroperoxycyclophosphamid ist ein ebenfalls von TAKAMIZAWA et al. synthetisiertes Derivat des natürlichen Umwandlungsproduktes 4-Hydroxycyclophosphamid, im Gegensatz zu diesem aber chemisch wesentlich stabiler und daher von erheblicher praktischer Bedeutung (44). In wässriger Lösung wandelt es sich spontan in das Hydroxyd und seine alkylierenden Folgeprodukte um (48).



Cyclophosphamid
(Endoxan^R)



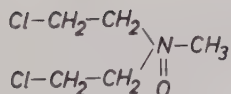
4-Hydroperoxy - Cyclophosphamid



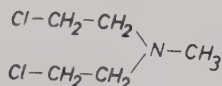
4-Hydroxy - Cyclophosphamid

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, durch Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen für verschiedene Substanzen festzustellen, wie weit der erwähnte Cyclophosphamid-resistente Yoshida-Ascites-tumor auch gegen alkylierende Cytostatika anderer chemischer Struktur Resistenz aufweist. Aus dem Grad der Kreuzresistenz sollen Rückschlüsse auf Gemeinsamkeiten des molekularen Wirkungsmechanismus gezogen werden. Dabei werden mögliche Mechanismen der Resistenzentwicklung diskutiert.

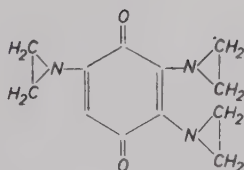
Alkylantien unterschiedlicher Struktur wurden ausgewählt: 4-Hydroperoxycyclophosphamid als Derivat des in vitro wirksamen natürlichen Metaboliten 4-Hydroxycyclophosphamid. Weitere Vertreter der Lost-Gruppe waren N-Oxyd-Lost (Mitomen^R) und N-Methyl-Lost. Aus der Gruppe der Äthylenimine wählten wir Triaziquon (Trenimon^R) aus.



N-Oxyd-Lost
(Mitomen^R)



N-Methyl-Lost



Triaziquon
(Trenimon^R)

Bisher wurde noch kein biochemischer Parameter gefunden, der eine causale Beziehung zur Hemmung der Zellproliferation aufwies und sich daher zum Vergleich unterschiedlicher Cytostatika eignete (33, 34). Die Hemmung der Zellvermehrung wurde daher als bisher empfindlichster Parameter für die Wirkung alkylierender Cytostatika zum Vergleich der einzelnen Substanzen herangezogen. Bestand Kreuzresistenz, so wurde dies als ein Hinweis auf einen gleichen molekularen Wirkungsmechanismus gewertet.

II. Material und Methoden

1. Versuchstiere:

Weibliche NMRI-Mäuse des Zentralinstitutes für Versuchstierzucht Hannover wurden verwendet. Sie waren 23-27 Gramm schwer, das Gewicht der Tiere einer Versuchsreihe unterschied sich um maximal 2 Gramm. Die Mäuse wurden bei Zimmertemperatur und Tageslicht gehalten, sie erhielten "Altromin"-Standardfutter und Leitungswasser ad libitum.

2. Tumorzellen:

Das Yoshida-Ascites-Sarkom wurde durch wöchentliche Transplantation in die Bauchhöhle von weiblichen NMRI-Mäusen gehalten. Die Resistenz des Tumors gegen Cyclophosphamid wurde erreicht, indem nach jeder zweiten Transplantation steigende Dosen des Medikaments i.p. appliziert wurden. Nach etwa neun Monaten war die hier beschriebene Resistenzstufe erreicht.

3. Cytostatisch wirksame Substanzen:

Triaziquon (Trenimon^R, Molekulargewicht 231) wurde von der BAYER AG, Leverkusen bezogen. Cyclophosphamid (Endoxan^R, MG 261), 4-Hydroperoxycyclophosphamid (MG 293), N-Oxyd-Lost (Mitomen^R, MG 171) und N-Methyl-Lost (MG 155) erhielten wir von der ASTA-Werke AG, Brackwede.

4. Bestimmung der Zellvermehrung nach in vitro Inkubation:

a) Inkubation: Die Tumorzellen wurden 5-7 Tage nach der Transplantation durch Punktion mit einer heparinisierten Spritze aus der Bauchhöhle der Ascitestumor tragenden Tiere entnommen. Dazu mußten die Tiere decapitiert und die Oberhaut auf der Bauchseite entfernt werden.

Anschließend wurden die Tumorzellen in gekühltem Inkubationsgemisch aufgenommen und filtriert, dann 10 Minuten bei 100 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml Inkubationsgemisch behutsam resuspendiert. Zur Inkubation wurde eine 1%ige Zellsuspension hergestellt.

Die Inkubationskolben, die mit Aceton und destilliertem Wasser gründlich gereinigt und getrocknet worden waren, enthielten 0,1 ml der gewünschten Cytostatikum-Verdünnung. 5 ml der Zellsuspension (50 µl Zellen) wurden 1 h lang bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen der Alkylantien im Schüttelthermostaten inkubiert. In jedem Versuch erfolgte die Inkubation einer Kontrollgruppe ohne Cytostatikum. Durch Einstellen der Kölbchen in Eiswasser wurde die Inkubation gestoppt.

Das Inkubationsmedium war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 90 ml Ringer-Lösung
- 30 ml Tris-Puffer pH 7,4
- 5 ml Phosphat-Puffer pH 7,4
- einige Tropfen Heparin.

b) Bestimmung der Zellvermehrung: Nach Ende der Inkubation wurden 0,5 ml der Zellsuspension (2,5 - 3,5 Millionen abgezählte Zellen) i.p. an unbehandelte Mäuse verimpft, nachdem deren Bauchhaut desinfiziert worden war. In der Regel inkubierten wir für jede Cytostatikakonzentration bei einem Versuch drei Kölbchen mit Zellsuspensionen, aus denen jeweils zwei Tiere beimpft wurden. Diese Tiere wurden nach 5 Tagen getötet (im Falle des Mitomens^R bereits nach 3 Tagen,

Abb. 4a und 4b), die Bauchhöhle mit Ringer-Lösung und Heparin gründlich ausgespült und die jeweilige Zellzahl bestimmt.

Die Zellzählungen wurden mit dem Coulter Counter Modell B vorgenommen (Kapillarbohrung 100 μ m). Dazu mußten die Zellsuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung entsprechend vorverdünnt werden, ein Leerwert von 4 Millionen "physiologischer Zellen" wurde abgezogen (vergl. 40).

Die Vermehrungsrate ergab sich aus der Zellzahl nach 5 Tagen Wachstum abzüglich des Leerwertes, geteilt durch die Zahl der implantierten Zellen. Das arithmetische Mittel der Vermehrungsraten der Kontrollen wurde gleich 100% gesetzt. Die Vermehrungsraten der behandelten Tumorzellen konnten dann in Prozent der Kontrollen angegeben werden.

5. Bestimmung der Zellvermehrung nach in vivo Applikation:

Einer Gruppe von 25 Mäusen wurde jeweils die gleiche Zellmenge i.p. implantiert. 5 Tage später erhielten die Tiere verschiedene Verdünnungen von Cyclophosphamid i.p., den Kontrolltieren wurde physiologische Kochsalzlösung injiziert. Nach weiteren 4 bis 5 Stunden (Cyclophosphamid ist dann vollständig resorbiert und metabolisiert (7)) wurden die Tiere getötet und der Ascites gewonnen. Aus jedem Ascites wurden abgezählte Zellmengen an unbehandelte Empfängertiere weiterverimpft. Diese wurden ebenfalls nach 5 Tagen getötet, der Ascites wie oben beschrieben gewonnen und die Zellzahl am Coulter-Counter bestimmt (s. 4 b).

6. Berechnung der Dosis-Wirkungs-Beziehung:

Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung darzustellen, errechneten wir aus allen Versuchen für jede Konzentration des betreffenden Cytostatikums die Mittelwerte $\bar{x}$ und die Standardabweichungen s der Vermehrungsraten als % der Kontrollen.

Mit einem Rechenprogramm der Olivetti Programma 101 wurden Regressionsgeraden berechnet (37) und im halblogarithmischen Maßstab dargestellt. Dabei gingen wir davon aus, daß im mittleren Teil der Dosis-Wirkungs-Kurve die Streuungen der Zellvermehrung normal verteilt sind und eine lineare Beziehung zum Logarithmus der eingesetzten Dosis besteht. Für die Regressionsgeraden gilt die Funktion:

$$y' = A + Bx$$

$$A = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$B = \frac{xy - x\sum y}{(x^2) - \bar{x}\sum x_i}$$

y' ist dabei der ausgeglichene y -Wert (Hemmung der Zellvermehrung gegenüber den Kontrollen) zu x , dem Logarithmus der Dosis des Cytostatikums. Durch Auflösen der Gleichung nach x kann zu jedem gewünschten y' , d.h. zur jeweiligen Hemmung der Zellvermehrung die Dosis berechnet werden.

$$\frac{y' - A}{B} = x$$

7. Berechnung des Resistenzfaktors:

Zunächst wurde für jedes der einzelnen Cyto-
statika die Dosis berechnet, die zur Hemmung
der Zellvermehrung auf 50 % der Kontrollen
führte (D_{50}). Der Resistenzfaktor wurde als
Quotient aus der D_{50} der resistenten und der
sensitiven Tumorzellen gebildet:

$$\frac{D_{50 \text{ res.}}}{D_{50 \text{ sens.}}} = \text{Resistenzfaktor}$$

Er erlaubt eine übersichtliche Darstellung der
Kreuzresistenz, ein Begriff, auf den in der
Diskussion näher eingegangen wird.

11i. Ergebnisse

1. Vergleich der Wirkung der Cytostatika gegen den sensitiven und den resistenten Yoshida-Ascitestumor

In den Abbildungen 1-5 a und b sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Cytostatika als Regressionsgeraden dargestellt. Mittelwerte $\bar{x}$, Standardabweichungen s und Anzahl der Tiere n sind eingetragen.

a) Cyclophosphamid (Endoxan^R):

Die Dosis-Wirkungs-Gerade des Cyclophosphamids für das sensitive YAS (Abb. 1a) liegt im Dosisbereich von $1,7 - 3,8 \cdot 10^{-6}$ Mol/kg Körpergewicht. Die D_{50} kann graphisch und rechnerisch mit $2,6 \cdot 10^{-6}$ Mol (0,68 mg) pro kg Körpergewicht ermittelt werden.

Der resistente Tumor benötigt dagegen Cyclophosphamiddosen zwischen $3,8$ und $15,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/kg Körpergewicht zur Hemmung der Zellvermehrung (Abb. 1b). Die D_{50} beträgt für ihn $6,8 \cdot 10^{-4}$ Mol (178 mg) pro kg Körpergewicht und damit 259 mal mehr als die des sensitiven Tumors (Resistenzfaktor = 259). Die Zellvermehrungsraten der Cyclophosphamid-Versuche unterliegen naturgemäß einer breiteren Streuung als die der unten erwähnten Inkubationsversuche, da die Tumorzellen in vivo behandelt und anschließend auf ein weiteres Tier übertragen werden mußten. BROCK und HOHORST wiesen nämlich nach, daß Cyclophosphamid erst in der Leber der Versuchstiere zu dem cytostatisch wirksamen Metaboliten "gegiftet" werden muß (7). Aus den Arbeiten von

BROCK (6,7,8), CONNORS (10,11,13), HILL (26), HOHORST (27, 28), PHILLIPS (38), SLADEK (42), TAKAMIZAWA (44) und VOELCKER (48) geht hervor, daß dieser Metabolit identisch ist mit 4-Hydroxycyclophosphamid.

b) 4-Hydroperoxycyclophosphamid (kurz: Peroxyd, Abb. 2a und 2b):

Das Peroxyd ist im Gegensatz zum Cyclophosphamid in vitro wirksam, und zwar gegen den sensitiven Yoshida-Ascitestumor ab einer Dosierung von $0,7 \cdot 10^{-7}$ Mol/L. Die D_{50} liegt bei $1,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/L.

Aus der Regressionsgerade des Peroxyds für den resistenten Tumor mit einem Dosisbereich von $1,4 - 6,8 \cdot 10^{-5}$ Mol/L ergibt sich eine D_{50} von $4,2 \cdot 10^{-5}$ Mol/L.

Der Resistenzfaktor beträgt 285. Er zeigt mit dem des Cyclophosphamids eine bemerkenswerte Übereinstimmung, denn bei der gegebenen Streubreite der Meßwerte besteht zwischen Resistenzfaktor 259 und 285 kein signifikanter Unterschied.

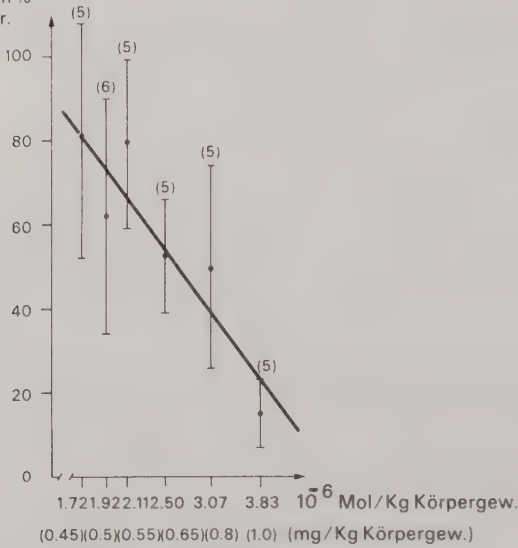
c) Triaziqun (Trenimon^R) (Abb. 3a und 3b):

Triaziqun ist bereits im Bereich von $4,3 - 13,0 \cdot 10^{-9}$ Mol/L gegen den sensitiven Yoshida-Ascitestumor wirksam. Mit einer D_{50} von $6,9 \cdot 10^{-9}$ Mol/L war es die Substanz, die am niedrigsten dosiert werden konnte.

Für den resistenten Tumor waren Konzentrationen zwischen $1,3$ und $3,0 \cdot 10^{-7}$ Mol/L notwendig. Die D_{50} lag bei $1,8 \cdot 10^{-7}$ Mol/L. Aus diesen Werten ergibt sich ein Resistenzfaktor von 26.

Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-sensitiver Yoshida Ascitestumorzellen durch Cyclophosphamid

Zellzahl in %
der Kontr.



0. 1b

Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-resistenter Yoshida-Ascitestumorzellen durch Cyclophosphamid

Zellzahl in %
der Kontr.

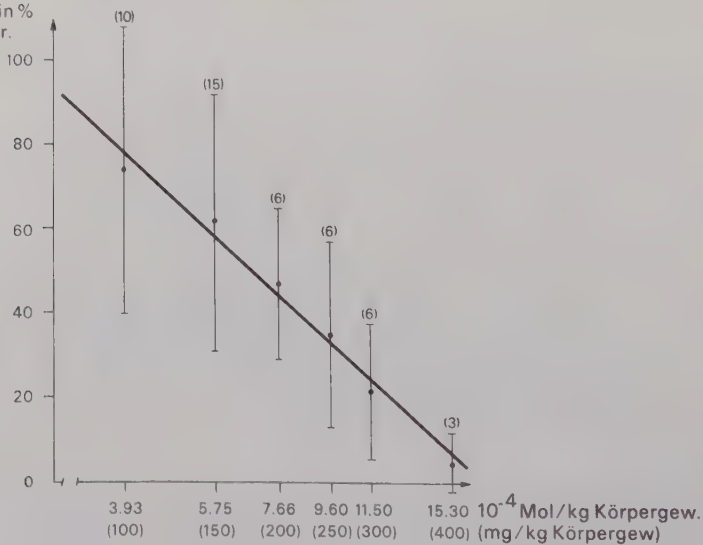


Abb. 2a

Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-sensitiver
Yoshida-Ascitestumorzellen durch 4-Hydroperoxycyclophosphamid

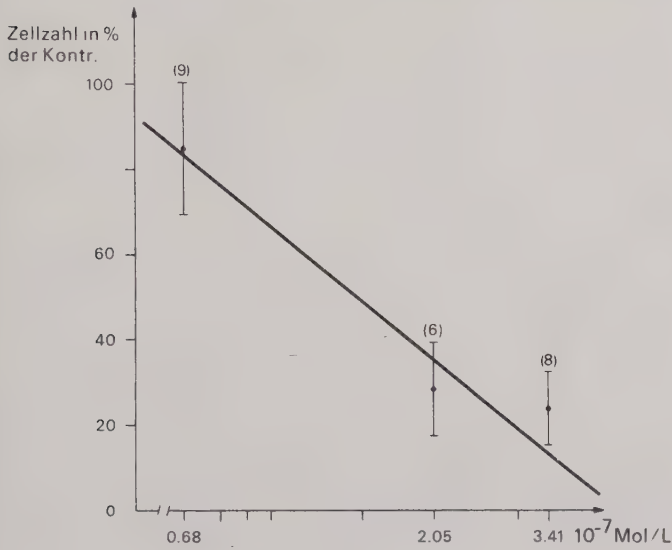
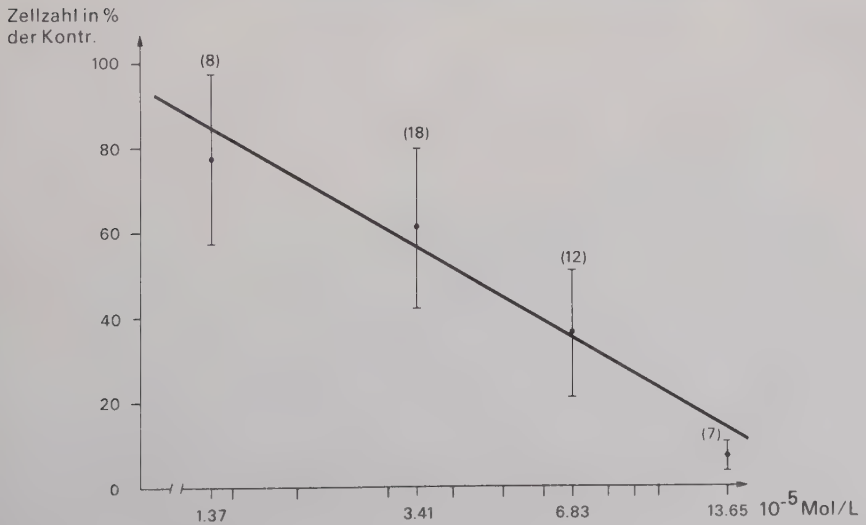


Abb. 2b

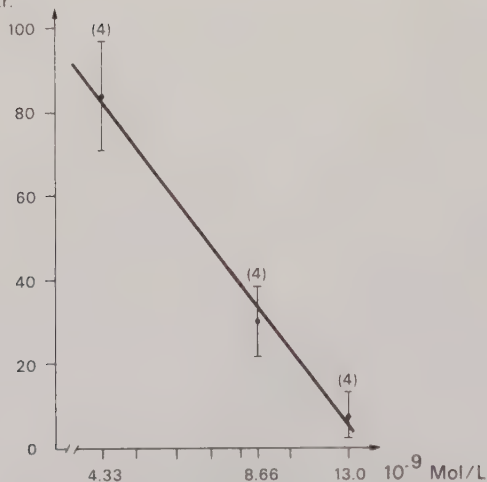
Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-resistenter
Yoshida-Ascitestumorzellen durch 4-Hydroperoxycyclophosphamid



ab. 3a

Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-sensitiver Yoshida-Ascitestumorzellen durch Triaziquon

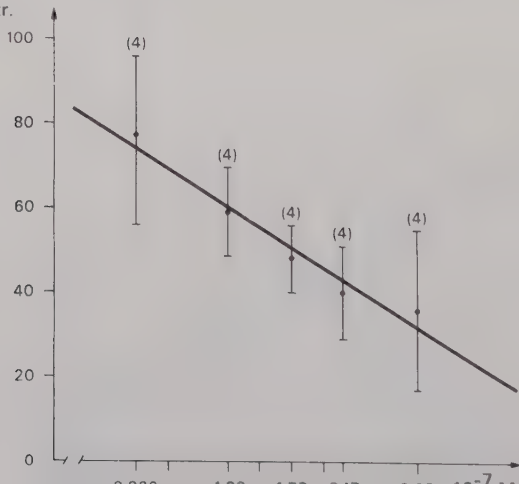
Zellzahl in %
der Kontr.



ab. 3b

Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-resistenter Yoshida-Ascitestumorzellen durch Triaziquon

Zellzahl in %
der Kontr.



- d) N-Oxyd-Lost (Mitomen^R) (Abb. 4a und 4b):
N-Oxyd-Lost mußte wesentlich höher dosiert werden. Die Hemmung der Vermehrung der sensitiven Yoshida-Ascitestumorzellen begann im Bereich von $0,8 - 3,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/L. Die D_{50} betrug $1,7 \cdot 10^{-5}$ Mol/L.

Der resistente Yoshida-Ascitestumor konnte von Konzentrationen ab $3,5 - 17,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/L in seiner Vermehrung gehemmt werden, es ergab sich eine D_{50} von $6,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/L. Der Resistenzfaktor beträgt somit 36.

- e) N-Methyl-Lost (Abb. 5a und 5b):
Die Zellvermehrung des sensitiven Tumors wurde bereits im Bereich von $0,65 - 3,9 \cdot 10^{-8}$ Mol/L gehemmt, die D_{50} liegt bei $1,7 \cdot 10^{-8}$ Mol/L.

Für den resistenten Tumor beginnt der cyto-statisch wirksame Konzentrationsbereich bei $0,65 - 1,9 \cdot 10^{-6}$ Mol/L, die D_{50} beträgt $1,1 \cdot 10^{-6}$ Mol/L. Der Resistenzfaktor für N-Methyl-Lost errechnet sich also zu 62.

Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-sensitiver Yoshida-Ascitestumorzellen durch N-Oxyd-Löst

Zellzahl in %
der Kontr.

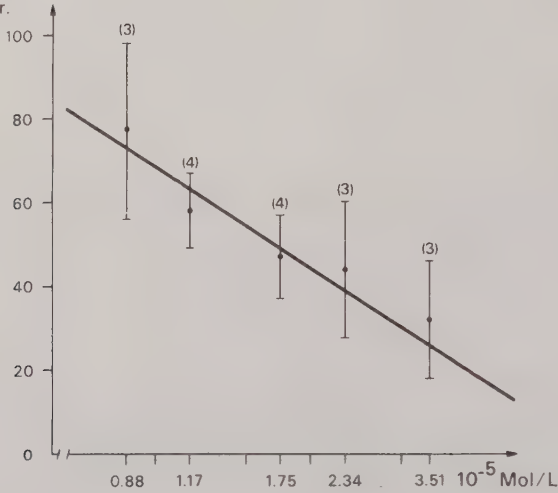


Abb. 4b

Hemmung der Vermehrung Cyclophosphamid-resistenter Yoshida-Ascitestumorzellen durch N-Oxyd-Löst

Zellzahl in %
der Kontr.

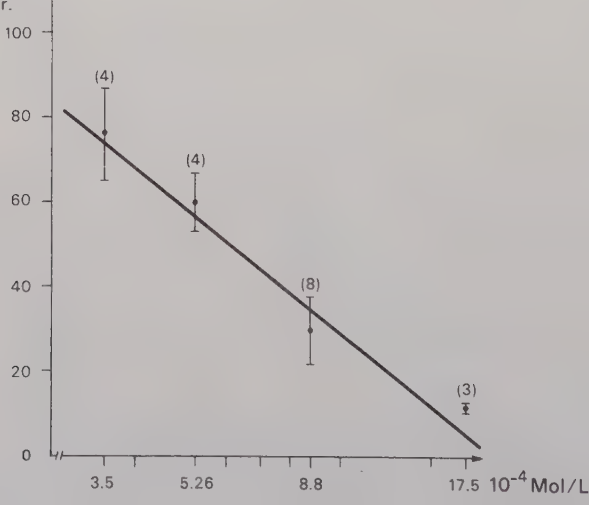


Abb. 5a

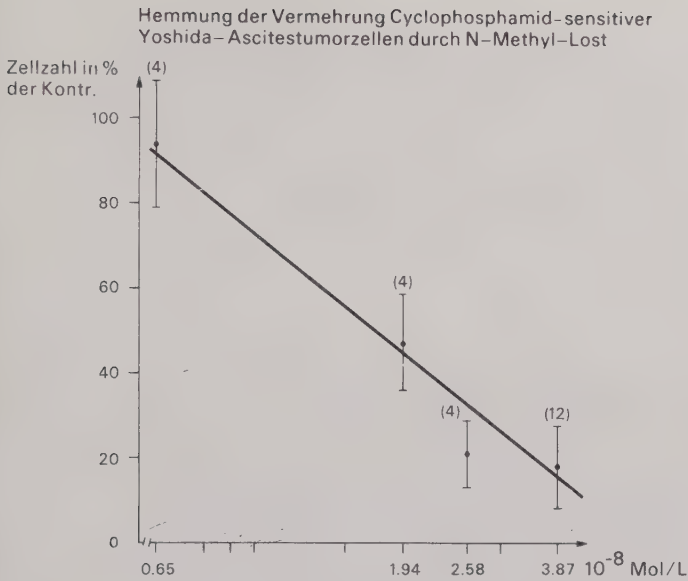


Abb. 5b

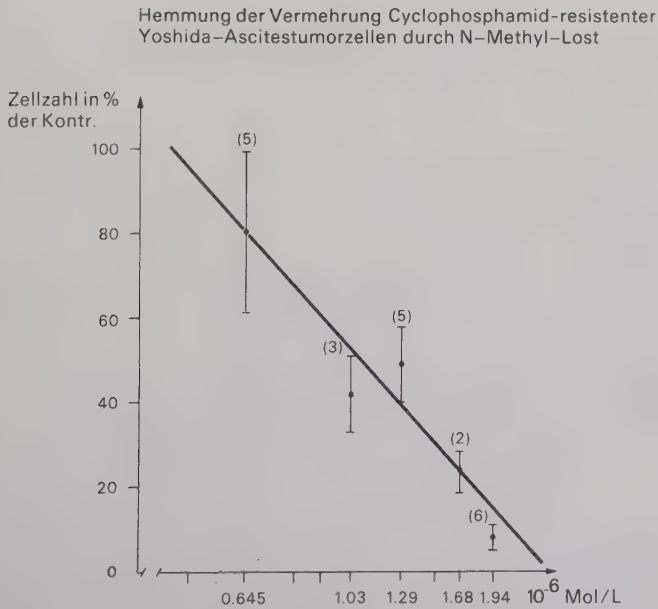


Tabelle 1 faßt die in 1a - 1e aufgeführten Daten zusammen. Für jedes der einzelnen Cytostatika ist die D_{50} angegeben, wobei die Werte für den sensitiven und den resistenten Tumor nebeneinander stehen. Dazu ist der Resistenzfaktor als Maß für den erreichten Resistenzgrad angegeben.

Tab.1

Hemmung der Zellvermehrung Cyclophosphamid-sensitiver und - resistenter Yoshida-Ascitestumorzellen durch verschiedene alkylierende Substanzen.

Angegeben ist die Konzentration in Mol pro Liter, die nach in vitro Inkubation (bzw. in Mol pro kg Körpergewicht nach in vivo Applikation) und anschließender Verimpfung der behandelten Zellen das Wachstum auf 50 % der Kontrollen verminderte.

Als Resistenzfaktor wird der Quotient aus der Dosis für resistente Zellen und der Dosis für sensitive Zellen angegeben.

	sensitive Zellen	resistente Zellen	Resistenz= faktor RF
Cyclophosphamid (in vivo appl.)	$2.6 \cdot 10^{-6}$ (0.68 mg)	$6.8 \cdot 10^{-4}$ (178.0 mg)	259
4-Hydroperoxy= cyclophosphamid	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$4.2 \cdot 10^{-5}$	285
Triaziquon (Trenimon ^R)	$6.9 \cdot 10^{-9}$	$1.8 \cdot 10^{-7}$	26
N-Oxyd-Lost (Mitomen ^R)	$1.7 \cdot 10^{-5}$	$6.2 \cdot 10^{-4}$	36
N-Methyl-Lost	$1.7 \cdot 10^{-8}$	$1.1 \cdot 10^{-6}$	62

2. Vergleich der Mengen der einzelnen Cytostatika, die zur Hemmung der Zellvermehrung auf 50% der Kontrollen notwendig sind

Die hier untersuchten Cytostatika entfalten ihre Wirkung auf die Zellvermehrung in z.T. sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Im Folgenden werden diese verglichen, wobei einmal die D_{50} des Triaziquons (Tab. 2), zum anderen die des Peroxyds (Tab. 3) als Bezug gewählt wurde, und zwar jeweils für den sensitiven und den resistenten Tumor.

Tab.2

Vergleich der D_{50} der einzelnen Cytostatika. Sie sind als ein Vielfaches der D_{50} des Triaziquons angegeben.

	sensitive Zellen	resistente Zellen
Cyclophosphamid (in vivo)	2645	265
Peroxyd	460	43
Triaziquon	1	1
N-Oxyd-Lost	40588	290
N-Methyl-Lost	41	16

Aus Tab. 2 ist ersichtlich, daß Triaziquon deutlich niedriger dosiert werden mußte als die anderen Substanzen.

Tab.3

Vergleich der D_{50} der einzelnen Cytostatika. Sie sind als ein Vielfaches der D_{50} des Peroxyds angegeben.

	sensitive Zellen	resistente Zellen
Cyclophosphamid (in vivo)	6	6
Peroxyd	1	1
Triaziquon	0.0021	0.023
N-Oxyd-Lost	88	290
N-Methyl-Lost	0.09	0.04

IV. Diskussion

1. Resistenzfaktor und Kreuzresistenz

Es war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, die Kreuzresistenz des Cyclophosphamid-resistenten Yoshida-Ascitestumors gegen weitere alkylierende Cytostatika zu bestimmen. Von Kreuzresistenz spricht man, wenn eine gegen eine bestimmte Substanz resistente Zellpopulation - im Gegensatz zum ursprünglichen Zelltyp, dem sie entstammt - zusätzlich Resistenz gegen andere Stoffe zeigt (29). Eine vollständige Kreuzresistenz spricht dafür, daß die Substanzen den gleichen Wirkungsmechanismus besitzen (10).

Der Grad der Kreuzresistenz läßt sich am besten durch den Resistenzfaktor ausdrücken. Er bezeichnet den Faktor, mit dem die für den sensitiven Tumor ermittelte Dosis multipliziert werden muß, um an der resistenten Population eine gleiche Wirkung zu erzielen.

Der resistente YAT mußte 259 mal soviel Cyclophosphamid erhalten wie der sensitive, um die Zellvermehrung auf 50% der Kontrollen zu hemmen.

Für das Peroxyd ergab sich ein Resistenzfaktor von 285, ein Wert, der sich unter Berücksichtigung der Streuungen der entsprechenden Versuche (Abb. 1a und 1b und 2a und 2b) nicht signifikant von dem des Cyclophosphamids unterscheidet. Der Cyclophosphamid-resistente YAT zeigt also für das Peroxyd vollständige Kreuzresistenz.

Für Triaziquon (Trenimon^R) besteht mit einem Resistenzfaktor von 26 eine partielle Kreuzresistenz, sie beträgt ca. 10% der Cyclophosphamid-Resistenz.

Das Gleiche gilt für N-Oxyd-Lost (Mitomen^R), dessen Resistenzfaktor mit einem Wert von 36 im gleichen Bereich liegt. Die Streuungen der Versuche (Abb. 3a und 3b und 4a und 4b) lassen eine signifikante Unterscheidung dieser beiden Resistenzfaktoren nicht zu.

Auch für das N-Methyl-Lost erweist sich mit einem Resistenzfaktor von 62 eine partielle Kreuzresistenz. Der Resistenzfaktor liegt hier zwar höher, es besteht aber zu dem des Triaziquons und dem des N-Oxyd-Lost ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Cyclophosphamid-resistente YAT gegen das Cyclophosphamid-Derivat 4-Hydroperoxycyclophosphamid vollständig kreuzresistent ist, während für andere alkylierende Cytostatika (N-Methyl-Lost, N-Oxyd-Lost und Triaziquon als Vertreter der Äthylenimine) eine partielle Kreuzresistenz besteht, die ca. 10 - 20 % der Cyclophosphamid-Resistenz beträgt.

Diese Befunde stehen in Einklang mit den Ergebnissen von BROCK (6, 7, 8), CONNORS (10, 11, 13), HILL (26), HOHORST (27, 28), PHILLIPS (38), SLADEK (42), TAKAMIZAWA (44) und VOELCKER (48), wonach der natürliche Metabolit 4-Hydroxycyclophosphamid ebenso wie sein synthetisches Derivat 4-Hydroperoxycyclophosphamid unter physiologischen Bedingungen in Aldophosphamid und seine alkylierenden Folgeprodukte Acrolein und N-Lost-Phosphorsäurediamid zerfällt.

Das Peroxyd, das chemisch stabiler ist als der hochempfindliche natürliche Metabolit 4-Hydroxycyclophosphamid (6), erweist sich somit als gut geeignet, Resistenztestungen von Tumoren in vitro durchzuführen, die Rückschlüsse auf die Wirkung von Cyclophosphamid in vivo zulassen. Bei solchen Testungen muß berücksichtigt werden, daß z. Zt. allein die Hemmung der Zellvermehrung der geeignete Parameter ist, um die Wirksamkeit alkylirender Cytostatika zu vergleichen (33, 34). Der ³H-Thymidineinbau oder andere Meßgrößen zellulärer Syntheseleistungen sind hierzu unbrauchbar, weil sie erst von Konzentrationen beeinflusst werden, die höher sind, als für die Hemmung der Zellvermehrung notwendig. Kombinierte klinisch-experimentelle Studien wurden von BASTERT et al. (3) angeregt.

Bemerkenswert ist, daß der resistente YAT eine partielle Kreuzresistenz gegen die anderen Cytostatika aufweist, die für alle getesteten Substanzen größenordnungsmäßig gleich ist. Dieser Umstand weist auf Gemeinsamkeiten im Wirkungsmechanismus hin, bezeichnet andererseits aber deutlich, daß für die Wirkung des Cyclophosphamids besondere Mechanismen bestehen, die möglicherweise die Ursache für den besonders günstigen therapeutischen Index des Cyclophosphamids darstellen (6, 27, 42).

2. Vergleich verschiedener Methoden zur Messung der Hemmung der Zellproliferation

Die hier durchgeführte Methodik zur Ermittlung der Zellvermehrungsraten ist genauer als die meisten der bisher beschriebenen Verfahren. Die Zellzahl

im Ascites wird durch Zählung einer Verdünnung am Coulter-Counter sehr präzise bestimmt und die D_{50} kann aus den so gewonnenen Dosis-Wirkungs-Beziehungen recht genau ermittelt werden. Da die Zellen in vitro inkubiert und dann verimpft wurden, konnten Fehler, die durch Makrophageneinwanderung nach in vivo-Applikation von Cytostatika entstehen (1,23) vermieden werden. Die in vivo-Verabfolgung einer "therapeutisch ineffektiven Dosis" und einer "kurativen Dosis (23) ist sicherlich mit höheren Fehlern behaftet.

Einige Untersucher beschränken sich auf die weitaus weniger aufwendige Feststellung des Tumoranzuwachsens bzw. der Überlebenszeit der beimpften Versuchstiere (2,8,9,13,26,39,42,47). Sie behelfen sich mit der Angabe der "halben effektiven Konzentration" (6,8), das ist die Konzentration einer Substanz, die nach Transplantation der vorbehandelten Zellen das Anwachsen des Tumors bei der Hälfte der Versuchstiere verhindert. Die Dosierung konnte auch so gewählt werden, daß die höchste Konzentration letal für das Versuchstier war, während eine geringere Dosis keine Wirkung zeigte. Es wurde dann die LD_{50} als die Hälfte der letalen Dosis angegeben (2, 39).

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die Ascites-tumorzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe zu "poolen" und anschließend die Zellmenge im Hämatokritröhrchen zu bestimmen (19, 50).

Einige Autoren bestimmten die Zellvermehrung cytologisch in Giemsa-gefärbten Ausstrichen (30,31,32), wobei eine Konzentration, die bei der Hälfte der

Zellen zu cytologischen Zeichen der Alkylantien-Wirkung führte, als "mittlere effektive Konzentration" vermerkt wurde (30).

Eine andere Methode, Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Cytostatika zu ermitteln, ergab sich bei der subcutanen Verimpfung von Tumorzellen. Die soliden Tumoren wurden abgemessen (15,32,41,49) oder nach Excision gewogen (12,14,44).

Einen einfachen und präzisen Test zur Bestimmung der Cytotoxizität von Substanzen beschrieb PHILLIPS(38). In vitro-Zellkulturen wurden nach Vorinkubation mit einem Cytostatikum angelegt und die Zellzahl nach einigen Tagen Wachstum im Hämatocytometer bestimmt.

Andere Methoden der in vitro-Zellkultur wurden von HILL (24), ISAKA und IZUMITANI (30) und SZENDE u.A. beschrieben (43).

3. Vergleich der Konzentrationsbereiche der untersuchten Cytostatika

Die Cytostatikakonzentrationen, die zur Hemmung der Zellvermehrung auf 50% der Kontrollen notwendig waren, lagen für die einzelnen Substanzen bis zu 5 Zehnerpotenzen auseinander (s. Tab. 2 und 3). Insbesondere Triaziquon konnte deutlich niedriger dosiert werden als die anderen Alkylantien, ein Umstand, der sich gut durch eine selektive Aufnahme des Triaziquons erklären läßt. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen werden 50% des angebotenen Triaziquons aufgenommen, während die Tumorzellen nur etwa 1% der Cyclophosphamid-Umwandlungsprodukte aus dem Medium resorbieren (40).

Auffällig ist, daß die Dosis des N-Oxyd-Lost für den sensitiven YAT mehr als das 40 000-fache der Triaziquondosis betragen mußte. Es liegt nahe, die Ursache hierfür in einer geringeren Aufnahme der Substanz in die Zelle zu suchen, bedingt durch die hydrophile Oxyd-Gruppe im Molekül. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, daß das lipophile N-Methyl-Lost mit seiner im Vergleich zum Triaziquon nur 44-fachen bzw. 16-fachen Dosis hinter diesem die wirksamste Substanz ist. Zusätzlich könnte eine langsamere Reaktion des N-Oxyd-Lost mit Zellbestandteilen für diese erhebliche Dosisdifferenz verantwortlich sein.

4. Mechanismen der Resistenz gegen alkylierende Cytostatika

Zahlreiche Versuche sind unternommen worden, zwischen sensitiven und resistenten Varianten von Tumoren biochemische Unterschiede festzustellen (1,2,9,12,21, 24,29,30,32,51). Die Ursache der Resistenz konnte jedoch nur selten eindeutig nachgewiesen werden. Folgende Möglichkeiten werden diskutiert:

a) Veränderungen im Metabolismus:

Eine Veränderung im Metabolismus eines Cytostatikums kann Ursache der Resistenz von Zellen gegen diese Substanz sein. Diese Möglichkeit ist für das Cyclophosphamid ganz besonders in Betracht zu ziehen, da es, wie oben erwähnt, erst in vivo "gegiftet" und anschließend entgiftet wird (7). Ein besonderer Metabolismus wurde von SLADEK (42) und von CONNORS u.A. (11) als mögliche Ursache für die verhältnismäßig tumorselektive Wirkung des Cyclophosphamids in Betracht gezogen. HUTCHINSON schlägt u.a. eine Veränderung metabolisierender Enzyme als Ursache für eine Resistenzentwicklung vor (29).

Im Falle des hier untersuchten Cyclophosphamid-resistenten Tumors scheidet aber eine verminderte Giftung der Substanz als Ursache für die Resistenz aus, da sich der Tumor ja gerade gegen das Peroxyd - dem synthetischen Derivat des natürlichen Metaboliten - als vollständig kreuz-resistent erweist.

b) Verminderte Substanzaufnahme:

Einige Autoren beschrieben eine verminderte Aufnahme von Cytostatika in resistente Tumorzellen. Eindeutige Befunde erbrachte die Arbeit von WOLPERT und RUDDON (50), die nachwiesen, daß die HN2-Aufnahme eines resistenten Ehrlich-Ascites-Tumors deutlich geringer war als bei seiner sensitiven Stammlinie. Sie zeigte viele Charakteristika eines membranabhängigen Transportsystems. Zusätzlich war die intracelluläre Bindung von HN2 verstärkt, so daß 80% des Alkylans gebunden blieb.

Auch B.T. HILL (24) vermutete als Ursache der Chlorambucil-Resistenz eines YAS eine verminderte Transportfähigkeit der Zellen für die Substanz. Andere Autoren konnten nur geringe Unterschiede in der Cytostatika-Aufnahme von Tumoren unterschiedlicher Sensivität feststellen. So konnte BIRBECK (5) zeigen, daß ein Chlorambucil-sensitiver YAT nur im unteren cytostatischen Dosisbereich etwas mehr Substanz aufnahm. als seine resistente Nebenlinie.

CHUN et al. stellten bei einem HN2-resistenten EAT fest, daß die Substanzaufnahme nur ein Viertel der für den sensitiven Tumor ermittelten Menge betrug (9). Allerdings reichte dieser Effekt nicht aus, um die hochgradige Resistenz des Tumors zu erklären.

Eine verminderte Aufnahme der Substanz kann jedoch bei dem vorliegenden YAT nicht für die Cyclophosphamid-Resistenz verantwortlich gemacht werden. Falls ihr nämlich eine bedeutsame Rolle zukäme, sollte man unterschiedliche Resistenzfaktoren für lipophile und hydrophile Substanzen erwarten. Diese liegen jedoch für Alkylantien beider Arten im gleichen Bereich (Tab. 1). Zusätzlich ist bekannt, daß Triaziquon wesentlich stärker von den Zellen aufgenommen wird als Cyclophosphamid-Umwandlungsprodukte (40). Dennoch zeigt aber gerade das Peroxyd vollständige Kreuzresistenz. Eine verminderte Substanzaufnahme in die Zelle ist somit als Ursache für die Cyclophosphamid-Resistenz des untersuchten Tumors unwahrscheinlich.

c) Metabolitenbereitstellung

HUTCHINSON erwähnte als eine Möglichkeit zur Resistenzentwicklung einen verminderten Metabolitenbedarf (29). In der Tat konnten WHEELER und ALEXANDER feststellen, daß Cyclophosphamid und eine Reihe weiterer Alkylantien in die de novo Synthese von Ribonucleotiden eingreifen (49). Die DNA-Synthese eines sensitiven Tumors wurde dadurch gehemmt, im Gegensatz zu seiner resistenten Variante.

GRUNICKE et al. wiesen nach, daß alkylierende Substanzen wie Triaziquon den aktiven Desoxythymidintransport durch Zellmembranen beeinträchtigen (18,20). Allerdings halten die Autoren dies nicht für die Ursache der Cytostase, sondern für ein Zeichen einer allgemeinen Membranschädigung. Immerhin könnte eine verminderte Empfindlichkeit der intrazellulären Transportsysteme gegen Alkylantien gut für die

Aufrechterhaltung der notwendigen Metabolitenkonzentrationen und somit für die Cytostatika-Resistenz verantwortlich sein.

Eine Arbeit von HARRAP und FURNESS zeigte allerdings, daß Chlorambucil keinen Einfluß auf die intrazelluläre NAD-Konzentration besitzt (22).

d) SH-Gruppen und nucleophile Gruppen als Schutz vor Alkylierung

WOLPERT und RUDDON zeigten, daß sensitive EAT-Zellen HN2 stärker banden als eine resistente Zellpopulation (50). Dies führten sie auf Veränderungen an intracellulären Bindungsstellen zurück, die den resistenten Zellen erlaubten, die Substanz wieder abzugeben.

HOHORST und RINGSDORF konnten belegen, daß die Reaktion freier Thiol-Gruppen mit 4-Hydroxy-Cyclophosphamid zu 4-S-R-mercapto-Cyclophosphamid-Derivaten eine Verminderung der alkylierenden Aktivität mit Fixierung der Substanz an Makromoleküle bewirkte (27,28).

Auch BALL und CONNORS vermuteten, daß für die Resistenz eines YAS gegen N-Lost eine hohe intracelluläre Konzentration von nucleophilen- oder SH-Gruppen verantwortlich sind (2). Diese Gruppen könnten die Alkylantien abbinden und so verhindern, daß die DNA durch Quervernetzung (45), durch Strangbruch (35,12,9) oder durch Bildung von DNA-Protein-Komplexen geschädigt wird (19,45).

e) Die Bedeutung von DNA-Reparaturmechanismen für eine Resistenz gegen alkylierende Cytostatika
GOLDACRE, LOVELESS und ROSS wiesen als Erste darauf hin, daß alkylierende Substanzen "cross-links" der

DNA mit nachfolgendem Strangbruch verursachen und so zu Chromosomenschäden führen könnten (16). MC GRATH und WILLIAMS konnten später die Existenz eines Reparaturmechanismus beweisen, der DNA-Bruchstücke von *E. coli* wieder zusammenfügte (35). TOSHINORI und TOSHIWO gelang der Nachweis eines Reparaturmechanismus, der in der Lage war, Doppelstrangbrüche in der DNA von Säugetier-Fibroblasten zu reparieren und so die Vermehrungsfähigkeit der Zellen wiederherzustellen (46). GOODMAN und POTTER zeigten, daß derartige Reparaturvorgänge auch in der Rattenleber ablaufen (17).

Hinweise dafür, daß ein Reparaturmechanismus auch Bedeutung für die Resistenz von Tumoren hat, ergaben sich schon aus den Arbeiten von BALL, CONNORS et al. (1), CHUN et al. (9), HARRAP und HILL (23) und CONNORS et al. (12). Unterstützt wurde diese Annahme durch eine Arbeit von GAUDIN und YIELDING, die zeigten, daß eine Kombination von alkylierenden Cytostatika und Hemmstoffen der Reparaturvorgänge wie Caffeine und Chloroquin die Wirkung auf die Zellvermehrung deutlich verstärkt (15). YIN, CHUN und RUTMAN konnten dann für einen N-Lost-resistenten EAT zeigen, daß Alkylierung, Quervernetzung und Knickung der DNA geringer war als bei der sensitiven Stammlinie (51). Während die Excision alkylierter DNA-Stücke bei beiden Tumorarten gleich war, zeigte die resistente Variante eine beschleunigte Wiederverbindung der DNA-Stränge.

Bei einem Vergleich der Wirkung von Anilin-Lost auf zwei Tumoren unterschiedlicher Sensivität und Herkunft stellten CONNORS und DOUBLE allerdings

fest, daß gerade der sensitive Tumor den weitaus höchsten DNA-turnover aufwies (12). Der Resistenzmechanismus mußte also in subtileren Vorgängen bestehen als nur dem Abbau alkylierten Materials aus der DNA.

f) Qualitative Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Tumorzellstämmen

Mikroskopisch sind sensitive und resistente Tumorzellstämme nicht zu unterscheiden (36). BALL, CONNORS et al. zeigten jedoch bei einem YAT, daß der sensitive Typ eine dreifach höhere Menge einer PAS-positiven Substanz enthielt als seine resistente Nebenlinie (1). Es handelte sich dabei nicht um Glykogen. Ob dieser Zellbestandteil ursächlich mit der Sensitivität der Zellen gegen Cytostatika verbunden war, konnte allerdings nicht beurteilt werden.

SZENDE et al. gelang der Nachweis eines "Resistenzfaktors", einer Substanz, die durch eine Dialysmembran übertragbar war, folglich ein Molekulargewicht von weniger als 10 000 besitzen mußte (43). Dieser "Resistenzfaktor" war in der Lage, die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegen Methyl-dimethansulfonat deutlich herabzusetzen. Der Autor deutete dies als "metabolische Zusammenarbeit", die es den Zellen ermöglichte, schneller eine Resistenz durch Selektion zu erreichen.

g) Chromosomenveränderungen als Ursache der Resistenz
ISAKA und IZUMITANI konnten durch Einzelzelltransplantation aus einer HN2-resistenten Tumor-

zellpopulation eine sensitive Variante isolieren, die Veränderungen der Chromosomen aufwies (30). Offenbar bestand der YAT aus einer gemischten Zellpopulation. HAKANSSON und CLAES stellten dar, daß ein chemisch induziertes Sarkom der Maus aus unterschiedlichen Zellklonen bestand, die höchst verschiedene Sensitivität gegen Melpalan besaßen (21).

UJHAZY untersuchte Chromosomen von Sarkomen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegen HN3. Er konnte keine Unterschiede des Karyotyps finden, insbesondere auch keine Cytostatikum-induzierte Deletion eines Chromosoms (47).

CHUN et al. errechneten die Zahl der DNA-Alkylierungen, die notwendig sind, um ein Gen zu inaktivieren. Sie stellten fest, daß schon ein Drittel der dafür erforderlichen Dosis ausreicht, um die Zellvermehrung zu hemmen (9). Sie vermuteten daher eine Verstärkung der Alkylantien-Wirkung durch einen Mechanismus, der komplexer sein mußte als einfache Gen-Inaktivierung.

Bisher lassen die Ergebnisse noch keine Entscheidung darüber zu, ob die Resistenzentwicklung von Tumorzellen durch Mutation oder Selektion vonstatten geht (43).

Auch die Frage nach dem Mechanismus, der der Resistenz des hier untersuchten YAS gegen Cyclophosphamid zugrunde liegt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Weitere Untersuchungen hierzu werden sicherlich auch zu neuen Erkenntnissen über den Wirkungsmechanismus alkylierender Cytostatika beitragen.

V. Zusammenfassung

Aus einem Yoshida-Ascitestumor wurde durch ansteigende Cyclophosphamid-Gaben eine resistente Nebenlinie gezüchtet. Die Wirkung einiger alkylierender Cytostatika auf den sensitiven und den resistenten Tumor wurde dann anhand der Hemmung der Zellproliferation bestimmt. Der Resistenzgrad ergab sich aus dem Vergleich der Cytostatika-Konzentrationen, die die Zellvermehrung auf 50% der Kontrollen hemmten.

Die gezüchtete Tumورlinie zeigte gegen Cyclophosphamid eine 259-fache Resistenz. Für 4-Hydroperoxycyclophosphamid bestand vollständige Kreuzresistenz. Gegen die Substanzen Triaziquon, N-Oxyd-Lost und N-Methyl-Lost war der Tumor partiell kreuzresistent, im Vergleich zum Cyclophosphamid betrug der Resistenzgrad nur 10 - 20%.

Demnach besitzt 4-Hydroperoxycyclophosphamid mit hoher Wahrscheinlichkeit den gleichen molekularen Wirkungsmechanismus wie Cyclophosphamid. Für die anderen Cytostatika aus der Äthylenimin- und Lost-Gruppe besteht entweder ein anderer Wirkungsmechanismus, oder sie sind bei prinzipiell gleicher Funktionsweise durch den hier vorliegenden Resistenzmechanismus nicht so gut zu beeinflussen. Eine im Vergleich zum sensitiven Tumor verminderte Giftung oder Aufnahme der Substanz ist nicht die Ursache der Resistenz.

VI. Literaturverzeichnis

1. BALL, C.R., CONNORS, T.A., COOPER, E.H. and TOPPING, N.E.:
Comparison of Nitrogen Mustard Sensitive and Resistant Yoshida Sarcomas. Effect of Treatment on Cell Kinetics
Neoplasma 14 (1967), 253-264
2. BALL, C.R., CONNORS, T.A., DOUBLE, J.A., UJHAZY, U. and WHISSON, M.E.:
Comparison of Nitrogen Mustard Sensitive and Resistant Yoshida Sarcomas
Int. J. Cancer 1 (1966), 319-327
3. BASTERT, G., SCHMIDT-MATTHIESSEN, H., VOELCKER, G., PETER, G., HOHORST, H.J.:
In vitro Sensibilitätstestung von Tumoren gegenüber aktiviertem Cyclophosphamid (4-Hydroxycyclophosphamid). Kurzzeitintubation von Originaltumorzellen und ^3H -Uridin bzw. ^3H -Thymidineinbau
Z. Krebsforsch. 84 (1975), 37
4. BENDER, R.A. and DEDRICK, R.L.:
Cytokinetic Aspects of Clinical Drug Resistance
Cancer Chemoth. Rep. 59 (1975), 805-809
5. BIRBECK, M.S.C., ROBERTSON, D. and HILL, B.T.:
An Autoradiographic Study of the Binding of ^3H -Chlorambucil to Cells of a Drug-Sensitive and Drug-Resistant Strain of the Yoshida Ascites Sarcoma
J. Microscopy 103 (1975), 239-248

6. BROCK, N. u.a.:
Die Entwicklung von Cyclophosphamid und
verwandten Oxazaphosphorinoxiden als Krebs-
Chemotherapeutika
in: Forschungsbericht T 76-36 des Bundes-
ministeriums für Forschung und Technologie (1976), 24-53.
7. BROCK, N. und HOHORST, H. J.:
Über die Aktivierung von Cyclophosphamid
im Warmblüterorganismus
Naturwiss. 49 (1962), 610
8. BROCK, N., HOHORST, H. J.:
Über die Aktivierung von Cyclophosphamid
in vivo und in vitro
Arzneim.-Forsch. 13 (1963), 1021-1030
9. CHUN, E.H.L., GONZALES, L., LEON, F.S.,
JONES, J. and RUTMAN, R.J.:
Differences in the In Vivo Alkylation and Cross-
Linking of Nitrogen Mustard Sensitive and
Resistant Lines of Lettre-Ehrlich Ascites Tumors
Cancer Res. 29 (1969), 1184-1194
10. CONNORS, T.A.:
Alkylating Agents
in: Topics of Current Chemistry 52 (1974), 141-171
11. CONNORS, T.A., COX, P.J., FARMER, P.B.,
FOSTER, A.B. und JARMAN, M.:
Some Studies of the Active Intermediates Formed
in the Microsomal Metabolism of Cyclophosphamid
and Isophosphamid
Biochem. Pharm. 23 (1974), 115-129

12. CONNORS, T.A. und DOUBLE, J.A.:
Alkylation of the DNA of Sensitive and Resistant Tumors by a Nitrogen Mustard Derivate
Int. J. Cancer 5 (1970), 375-383
13. CONNORS, T.A., FOSTER, A.B., GILSEMAN, A.M.,
JARMAN, M. and TISDALE, M.J.:
Observations on the Metabolism of Cyclophosphamide
Biochem. Pharm. 21 (1972), 1373-1376
14. CSANYI, E. and HALASZ, M.:
Cross-Resistance Studies on 1,6-Dibromodideoxy-d-mannitol (DBM)-Resistant Yoshida S.C. Sarcoma
Brit. J. Cancer 21 (1967), 353-357
15. GAUDIN, D. and YIELDING, K.L.:
Response of a Resistant Plasmacytoma to Alkylating Agents and X-Ray in Combination with the Excision Repair Inhibitors Caffeine and Chloroquine
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131 (1969), 1413-1416
16. GOLDBACRE, R.J., LOVELESS, A. and ROSS, W.C.J.:
The Mode of Production of Chromosome Abnormalities by Nitrogen Mustard: Possible Role of Cross-Linking
Nature 163 (1949), 667-669
17. GOODMAN, J.I. and POTTER, R.V.:
Evidence for DNA Repair Synthesis and Turnover in Rat Liver Following Ingestion of 3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene
Cancer Res. 32 (1972), 766-775

18. GRUNICKE, H.:
Untersuchungen zu den molekularen Wirkmechanismen
von Triaziquon und Distamycin A
in: Forschungsbericht T 76-36 des Bundes-
ministeriums für Forschung und Technologie
(1976), 188-198
19. GRUNICKE, H., BOCK, K.W., BECHER, H., GÄNG, V.,
SCHNIERDA, J. and PUSCHENDORF, B.:
Effect of Alkylating Antitumor Agents on the
Binding of DNA to Protein
Cancer Res. 33 (1973), 1048
20. GRUNICKE, H., HIRSCH, H., WOLF, H., BAUER, V.
and KIEFER, G.:
Selective Inhibition of Thymidine Transport at
Low Doses of the Alkylating Agent Trenimon
Exp. Cell Res. 90 (1975), 357
21. HAKANSSON, L. und TROPÉ, C.:
On the Presence Within Tumors of Clones That
Differ in Sensitivity to Cytostatic Drugs
Acta path. microbiol. scand. 82 (1974), 35-40
22. HARRAP, K.R. and FURNESS, M.E.:
The Cytotoxicity of Chlorambucil and its
Associated Effects on NAD Metabolism
Europ. J. Cancer 9 (1973), 343-351
23. HARRAP, K.R. and HILL, B.T.:
The selectivity of Action of Alkylating Agents and
Drug Resistance. Part II: A Comparison of the
Effects of Alkylating Drugs on Growth Inhibition and
Cell Size in Sensitive and Resistant Strains of the
Yoshida Ascites Sarcoma
Br. J. Cancer 23 (1969), 227-234

24. HILL, B.T.:
Differential Effects of Cytotoxic Concentrations
of Chlorambucil on Drug-Resistant and Drug-Sensitive
Cell Lines of the Yoshida Ascites Sarcoma in Culture
Europ. J. Cancer 11 (1975), 9-16
25. HILL, D.L.:
A Review of Cyclophosphamide
Charles C. Thomas Publisher, Springfield,
Illinois, USA (1975)
26. HILL, D.L., LASTER, W.R. and STRUCK, R.F.:
Enzymatic Metabolism of Cyclophosphamid and Nicotine
and Production of a Toxic Cyclophosphamide Metabolite
Cancer Res. 32 (1972), 658-665
27. HOHORST, H.J.:
Untersuchungen zur Spezifität alkylierender Zytostatika:
Metabolismus und Wirkmechanismus von zyklischen
Stickstoff-Lost-Oxazaphosphorin-Verbindungen
in: Forschungsbericht T 76-36 des Bundesministeriums
für Forschung und Technologie (1976), 54-74
28. HOHORST, H.J. und RINGSDORF, H.:
Strukturaufklärung von Metaboliten und Derivaten
des Cyclophosphamid durch Elektronenstoß- und
Felddesorptions-Massenspektrometrie
in: Forschungsbericht T 76-36 des Bundesministeriums
für Forschung und Technologie (1976), 75-85
29. HUTCHINSON, D.J.:
Studies on Cross-Resistance and Collateral
Sensitivity (1962-1964)
Cancer Res. 25 (1965), 1581-1594

30. ISAKA, H., IZUMITANI, M., MORIWAKI, A. and SAKURAI, Y.:
Isolation and Characterisation of Nitrogen Mustard-Sensitive Cells from a Nitrogen Mustard-Resistant Subline of Yoshida Sarcoma
Gann 57 (1966), 353-366
31. KLEIN, H.O.:
Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen zur zellphasenspezifischen zytostatischen Therapie nach Induktion einer partiellen Synchronisation der Tumorzellproliferation
in: Forschungsbericht T 76-36 des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (1976), 115-200
32. LAUX, D.C. and LAUSCH, R.N.:
Evaluating of Factors Contributing to Tumor Resistance to Cyclophosphamide
J. Nat. Cancer Inst. 52 (1974), 863-868
33. LISS, E.:
Zum Wirkungsmechanismus alkylierender Cytostatika
Habil. Schrift an der Freien Universität Berlin (1966)
34. LISS, E., REINECKE, A. und PALME, G.:
Die Hemmung der DNS-Synthese und die Beeinflussung der Zellvermehrung von Yoshida-Ascitestumorzellen durch alkylierende Substanzen
Arzneim.-Forsch. 19 (1969), 1137-1140
35. MC GRATH, R.A. and WILLIAMS, R.W.:
Reconstruction In Vivo of Irradiated E. Coli Desoxyribonucleic Acid; The Rejoining of Broken Pieces
Nature 212 (1966), 534-535

36. MOLNAR, Z. and BEKESI, J.G.:
Effects of D-Glucosamine, D-Mannosamine and
2,-Desoxy-D-Glucose on the Ultrastructure of
Ascites Tumor Cells In Vitro
Cancer Res. 32 (1972), 380-389
37. OLIVETTI:
Programma 101: Statistische Programmsammlung,
Programm Nr. 201, 101
38. PHILLIPS, B.J.:
A Simple, Small Scale Cytotoxicity Test, and
its Uses in Drug Metabolism Studies
Biochem. Pharm. (1973), 131-139
39. SCHMÄHL, D. und DRUCKREY, H.:
Beiträge zum Wirkmechanismus von N-Oxyd-Lost
Naturwiss. 43 (1956), 199
40. SCHMIDT, H.:
Unterschiedliche Aufnahme zweier alkylierender
Cytostatika durch Ascites-Tumorzellen
Diss. an der Freien Univ. Berlin (1974)
41. SKIPPER, H.E. and SCHABEL, F.M.:
Experiments Evaluating of Potential Anticancer
Agents VII. Cross-Resistance of Alkylating
Agent-Resistant Neoplasms
Cancer Chem. Rep. 22 (1962), 1-22
42. SLADEK, N.E.:
Bioessay and Relative Cytotoxic Potency of
Cyclophosphamid Metabolites Generated In Vitro
and In Vivo
Cancer Res. 33 (1973), 1150 - 1158

43. SZENDE, B., FOX, M. and FOX, B.W.:
A Transferable "Resistance Factor" from
In Vitro Cultured MDMS-Resistant Yoshida
Sarcoma Cells
Br. J. Cancer 27 (1973), 245-252
44. TAKAMIZAWA, A., MATSUMOTO, S., IWATA, T.,
KATAGIRI, K., TOCHINO, Y. and YAMAGUCHI, K.:
Studies on Cyclophosphamide Metabolites and Their
Related Compounds. Preparation of an Active
Species of Cyclophosphamide and Some Related
Compounds
J. Amer. Chem. Soc. 95 (1973), 985
45. TOSHINORI, I. and TOSHIWO, A.:
Scissions of Proteins Linking DNA in Cultured
Mammalian Cells Induced by 4-Nitroquinoline
1-Oxide and Their Repair
Cancer Res. 32 (1972), 1236-1243
46. TOSHIWO, A. and TOSHINORI, I.:
Strand Scission and Rejoining of DNA in Cultured
Mammalian Cells Induced by 4-Nitroquinoline
1-oxide
Cancer Res. 32 (1972), 1230-1235
47. UJHAZY, V.:
Identical Karyotypes in Acquired Drug-Resistant
Sublines of Yoshida Sarcoma
Neoplasma 21 (1974), 665-669

48. VOELCKER, G., DRAEGER, U., PETER, G. und HOHORST, H.J.:
Studien zum Spontanzerfall von 4-Hydroxycyclophosphamid
und 4-Hydroperoxycyclophosphamid mit Hilfe der
Dünnschichtchromatographie
Arzneim.-Forsch. 24 (1974), 1172-1176
49. WHEELER, G.R. and ALEXANDER, J.A.:
Studies With Mustards VI. Effects of Alkylating
Agents Upon Nucleic Acid Synthesis in
Bilaterally Grown Sensitive and Resistant Tumors
Cancer Res. 24 (1964), 1338-1346
50. WOLFERT, M.K. and RUDDON, R.W. :
A Studie on the Mechanism of Resistance to
Nitrogen Mustard (HN2) in Ehrlich Ascites Tumor Cells:
Comparison of Uptake of HN2-C¹⁴ into Sensitive
and Resistant Cells
Cancer Res. 29 (1969), 873-879
51. YIN, L., CHUN, E.H.L. and RUTMAN, R.J.:
A Comparison of the Effects of Alkylation on the
DNA of Sensitive and Resistant Lettré-Ehrlich
Cells Following In Vivo Exposure to Nitrogen
Mustard
Biochim. Biophys. Acta 324 (1973). 472-481

Herrn Professor E. Liss danke ich für
das Thema und für die wertvolle Unter-
stützung bei den experimentellen Arbeiten

Lebenslauf

Am 21. April 1950 wurde ich in Berlin geboren. Mein Vater, Prof. Heinrich Gerhartz, ist Internist, und meine Mutter, Dr. Ingrid Gerhartz geborene Franck, übt ihren Beruf als Dipl.-Psychologin aus.

Von 1956 bis 1962 Besuch der Tews-Grundschule in Berlin-Nikolassee, anschließend des sprachlichen Zweiges der Dreilinden-Oberschule in Berlin-Wannsee. Im Februar 1969 Abitur an dieser Schule.

Im Sommer 1969 Arbeit als Werkstudent bei der Farbwerke Hoechst AG in Frankfurt.

Im Wintersemester 1969/70 Chemiestudium an der Universität Göttingen.

Zum Sommersemester 1970 Fachwechsel, Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin. Naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 1971, ärztliche Vorprüfung im September 1972. Staatsexamen an der FUB im Februar 1976.

April bis Juli 1976 Medizinalassistentenzeit an der Medizinischen Klinik des Klinikums Steglitz, im Oktober und November 1976 am Institut für Klinische Chemie und Biochemie im Klinikum Steglitz.

Zur Zeit Medizinalassistent an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Steglitz.

**SCHNELL
DRUCK
STEGLITZ**

791 80 80

BERLINCKESTRASSE 14-15
1000 BERLIN 41

